

最近の技術から

神経回路網解析法としての蛍光色素法

鞠負 正雄・小長谷初枝

(財)東京都神経科学総合研究所・機能系・医学心理学研究部門 T183 府中市武蔵台 2-6

1. はじめに

脳の神経回路網の知識は、ここ二十数年の解剖学的研究によって飛躍的に増大した。その背景には 1970 年代はじめのオートラジオグラフィー法や HRP (horse-radish peroxidase; 西洋ワサビ過酸化酵素) 法および蛍光色素法などの標識法の出現が大きな役割を果たしている。本稿では、この標識法の一種の蛍光色素法の基本的な原理と蛍光色素法を用いた著者らの研究の一部を簡単に紹介する。

2. 蛍光色素法の原理

蛍光色素法は、神経突起による外因性蛋白（蛍光色素）の取込みと軸索内逆行性（神経終末から細胞体へ向かう）輸送という細胞の性質を利用した方法である（図 1）。1970 年に Evans blue が逆行性に軸索内輸送されることを Kristensson¹⁾ が報告して以来、これまで多くの蛍光色素が神経回路解析に使用されてきた。蛍光色素法の最大の利点は、同一被験体の脳の複数領野に発色の異なる蛍光色素を注入することによってそれらの注入領野域に投射する起始細胞の分布の特徴を比較検討できることで、複数の領野に同時に投射する細胞の存在や投射の部位対応関係を明らかにすることができるのである。また、蛍光色素法は薄切後の組織化学的処理を必要とせず、薄切切片をスライドグラスにのせ、蛍光顕微鏡を用いて観察すればよいので極めて簡単である。しかし、最大の短所は、露光による蛍光発色の低下、消退が非常に速い（露光や温度の変化などにより蛍光物質の分子構造の変化を生じ蛍光を発しなくなる）ことから長期間の安定した標本の観察が困難であるので定量的評価が難しいことである。著者らは、顕微鏡に取り付けた超高感度テレビカメラよりコンピュータに蛍光像を取り込み、データの保存とその定量的解析に努めている。

3. 蛍光色素法による研究

図 2 は、これまでよく知られているサルの大脳皮質に

おける主な視覚領野とそれらの間の神経回路を示す。この中で、下部側頭回皮質にある TE 野は、その摘除によって物体の認知や記憶の機能障害を生ずることがよく知られている。TE 野が視覚性認知や記憶に関係する背景には TE 野が、情動や記憶に関係の深い扁桃核や海馬、

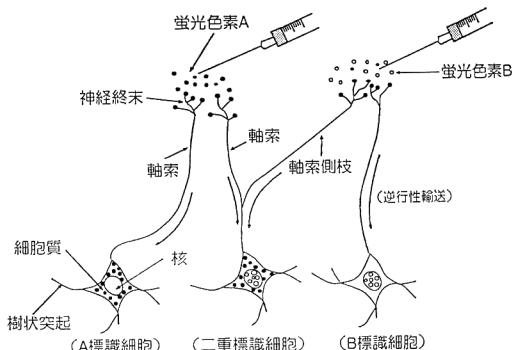


図 1 神経細胞による蛍光色素の取込みと逆行性軸索輸送

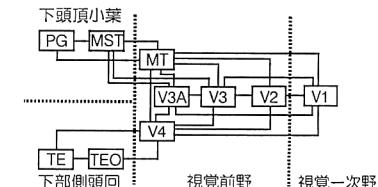
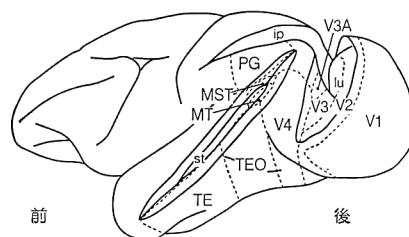


図 2 サルの大脳皮質における主な視覚領野（上段）とそれらの間の神経結合（下段）。図中、月状溝 (lu), 上側頭溝 (st), 頭頂間溝 (ip) を開いて描いてあることに注意。V1 野から V2 野, V4 野を経て TEO 野, TE 野に至る経路で物体の形や色の情報の分析、統合が行われている。

海馬傍回との間に密接な投射関係を持っていることが挙げられる。TE野とこれらの構造との関係については、TE野の背側部が扁桃核と強い投射関係を持つに対し、腹側部は海馬と海馬傍回皮質との間に密接な投射関係を持つ、というようにTE野の背側部と腹側部の間でその投射関係が異なっていることが明らかになっている²⁾。そこで、このTE野の背側部と腹側部がどのように視覚入力を受けているか蛍光色素法を用いて検討した³⁾。図3は、TE野の背側部と腹側部にdiamidino

yellow (DY) と fast blue (FB) を微量注入した一例の結果である。DYは、逆行性輸送の結果細胞の核に蓄積され黄色の発色を示すのに対して、FBは細胞質に蓄積され青く発色するので形と色から各々の標識が識別でき、二重標識も容易に同定できる(図1参照)。図3に明らかなように、TE野の背側部と腹側部はV4野やTEO野の同じ部位からよりむしろ互いに異なる部位から入力を受けている。また、同じ部位でも二重標識された細胞は全く見られなかった。この陰性所見は、TE野の背側部と腹側部の両方に同じ情報を送る細胞が存在しないことを示す。図4に他の注入例の結果も含めて投射関係をまとめた。こうした研究から、視覚性認知と記憶に関する視覚情報処理過程は、扁桃核に連なるTE野背側部視覚経路と海馬傍回や海馬に連なる腹側部視覚経路に分かれ、それぞれ認知過程と記憶過程に深く関係していることが推論される。

4. おわりに

本稿では、蛍光色素法を利用したサルの視覚連合野における神経回路研究の一端を紹介した。特に、サルを用いた研究では、個体差や被験体数などの問題の点からも蛍光色素法は極めて有用であると思われる。さらに、蛍光色素法は、HRP法など他の方法との組合せも可能であり、こうした組合せの工夫によりさらに精細な神経回路網の解析が期待できる。

文 献

- 1) K. Kristensson: "Transport of fluorescent protein tracers in peripheral nerves," *Acta Neuropathol.* (Berlin), **16** (1970) 293-300.
- 2) M. Yukie, K. Hikosaka and E. Iwai: "Organization of cortical visual projections to the dorsal and ventral parts of area TE of the inferotemporal cortex in macaques," *Abstr. Soc. Neurosci.*, **18** (1992) 294.
- 3) M. Yukie, H. Takeuchi, Y. Hasegawa and E. Iwai: "Differential connectivity of inferotemporal area TE with the amygdala and the hippocampus in the monkey" *Vision, Memory, and the Temporal Lobe*, eds. E. Iwai and M. Mishkin (Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1990) pp. 129-135.

(1994年9月6日受理)

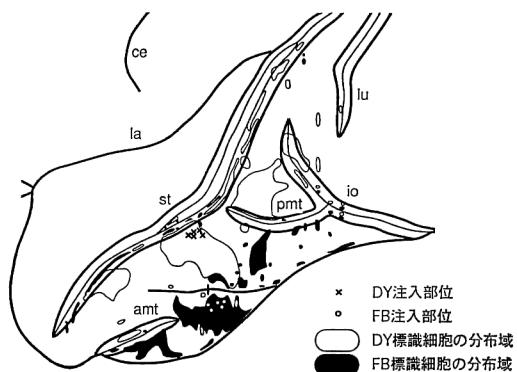


図3 サルTE野後半部の背側部と腹側部にFBとDYを各々注入した例における標識細胞の分布を示す側頭-後頭葉の外側面図。図中、多くの脳溝を開いて描いてあることに注意。

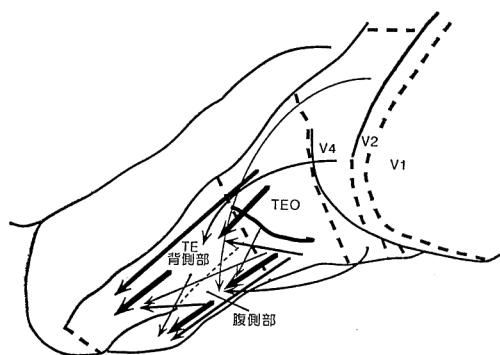


図4 蛍光色素法により明らかにされたTE野背側部と腹側部へ至る視覚入力経路。線の太さは投射の相対的強さを示す。